



TITLE:

Rhodospirillum rubrumにおけるL-チトラマル酸の生成経路に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

大隅, 隆

CITATION:

大隅, 隆. Rhodospirillum rubrumにおけるL-チトラマル酸の生成経路に関する研究. 京都大学, 1977, 理学博士

ISSUE DATE:

1977-03-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k1845>

RIGHT:

學位申請論文

大隅隆

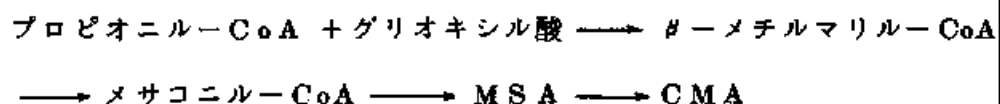
論 文 内 容 の 要 旨

報 告 番 号	甲 第 号	氏 名	大 隅 隆
論文調査担当者	主 査 香 月 裕 彦 波 多 野 博 行 ・ 丸 山 和 博		
<p>(論 文 題 目)</p> <p style="text-align: center;">Rhodospirillum rubrum における L-チトラマル酸の 生成経路に関する研究</p>			
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>自然界には、イタコン酸およびチトラマル酸 (CMA) などのように、側鎖にメチレン基やメチル基をもつ、炭素数 5 の二塩基酸 (C₅-一分岐二塩基酸) が多種類存在している。しかしながら、これらの有機酸の生合成、相互転換および分解の機構については十分に研究されていない。とくに β-メチルリンゴ酸 (MMA) については、種々の推測がなされているにもかかわらず、その存在すら証明されていなかった。申請者は、光合成菌 <i>Rhodospirillum rubrum</i> の中間代謝において MMA が重要な役割を果たす可能性があると考え、次のような実験を行なった。すなわち、(¹⁴C)-プロピオン酸とグリオキシル酸とを、ATP, CoA, Mg²⁺ および Mn²⁺ 存在下に、菌の無細胞抽出液と共にインキュベートした。生成物中の二塩基酸をペーパークロ</p>			

マトグラフィー、ガスクロマトグラフィーおよび再結晶法などの方法によって分析したところ、erythro-MMA、CoA およびメサコン酸(MSA)が生成していることがわかった。MMAおよびCMAは、それぞれ、チミンおよびクロラリドへ導くことにより、また、MSAは再結晶法により同定した。ブルシンを用いた光学分割と *Clostridium tetanomorphum* のチトラマル酸開裂酵素とを用いた実験結果から、CMAはL-型であることが確認された。しかしながら、MMAの光学分割は成功しなかったので、いずれの光学異性体に属するかについては結論が得られなかった。

ついで、これらの有機酸の生成順序を決定するため、反応の時間経過を追跡した結果、CMAはMMAから二次的に生成することが示された。高濃度の酵素液を用いた場合、または反応の途中に一旦セミカルバジドを加えてその後の縮合反応の進行を止めた後にさらに反応を続けた場合には、生成物中のCMA:MMAの比が著しく増加したことも、上記の推論が正しいことを示した。生成したCMA分子中の¹⁴Cの位置を決定するために、チトラマル酸開裂酵素を作用させてピルビン酸に導き、これに乳酸脱水素酵素を作用させたところ、放射性乳酸が生成していることがわかった。このことはCMAの α -カルボキシル基がラベルされていること、云いかえれば、このカルボキシル基がMMAの β -カルボキシル基に由来することを示している。したがって、CMAはMMAの水酸基の移動によって生じたものであると考えられた。この反応においてMSAは反応中間体である可能性が大であるので、非放射性メサコン酸存在下に反応を行わせ、CMAの放射能の希釈効果を調べた。その結果、予期した通り、高い放射能がMSAに見られ、これに応じて、CMA中の放射能は激減した。また、MSAを無細胞抽出液とインキューベートすると、CMAの生成が認められた。また、この反応はFeSO₄の

添加により促進され，*o*-phenanthroline の添加により阻止されたので，メサコナーゼによって触媒される反応であると推測された。これらの結果はMSAがMMAとCMAとの中間に位置する代謝中間体であることを示している。この稀釈実験においてMSAの代りにMMAを加えた場合には全く稀釈効果は認められなかったので，MMAは中間体でないことは明らかである。〔 ^{14}C 〕。グリオキシル酸とプロピオニル-CoA との直接の縮合生成物を証明するために，反応生成物をSephadex G-10カラムクロマトグラフィーにかけた。クロマトグラムは2つの放射能のピークの存在を示し，CoA およびMSAのピークと一致した。反応生成物をアルカリ処理した後にクロマトグラフィーにかけると，前者のピークは消失し，後者のピークのみが認められた。後者を分析した結果，放射能はMMAおよびMSAに存在することがわかった。酵素濃度を高くして反応を行わせると，CMAにも放射能が認められた。これらの結果はMMAおよびMSAがCoA 誘導体として反応に関与していることを示唆している。以上の実験結果から *Rhodospirillum rubrum* の無細胞抽出液は次の反応を触媒することが明らかになった。



参考論文3は，主論文において扱った分岐二塩基酸代謝に関連し，土壌より単離した好気性細菌のメサコナーゼの生理的役割を明らかにしたものであり，同2および3は，それぞれ，酵母のステロールエステルの細胞内における役割と生合成経路を推定した研究である。

()

理学博士学位申請論文

Rhodospirillum rubrum における L-チトラマル

酸の生成経路に関する研究

大 隅 隆

京都大学大学院理学研究
科博士課程（化学専攻）

（昭和52年3月所定単位修得見込）

本論文の主要部分の内容は下記論文として公表(予定)。

1. Formation of β -Methylmalate and Its Conversion to Citramalate in

Rhodospirillum rubrum

Takashi Osumi, Toichi Ebisuno, Hidehiko Nakano, and Hirohiko Katsuki

The Journal of Biochemistry, 78, 763-772 (1975)

2. A Novel Pathway for L-Citramalate Synthesis in Rhodospirillum rubrum

Takashi Osumi and Hirohiko Katsuki

The Journal of Biochemistry, in press (1977)

本論文で使用した略号は次の通りである。

CMA: Citramalate

MMA: β -Methylmalate

MM-CoA: β -Methylmalyl-CoA

MSA: Mesoaconate

MS-CoA: Mesoconyl-CoA

CCA: Citraconate

HGA: α -Hydroxyglutarate

Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane

図および表中の見出しや物質名などは、英語で表示した。

目 次

1. はじめに	1
2. 実験材料および実験方法	
2.1. 菌の培養	17
2.2. 無細胞抽出液の調製	19
2.3. 試薬	20
2.4. 反応条件	21
2.5. 反応生成物の分析	22
2.6. 放射活性の測定	25
2.7. 蛋白質の定量	26
3. 実験結果	
3.1. 反応生成物の同定	27
3.2. MMAおよびCMAの立体構造	40
3.3. 基質・補酵素要求性	46
3.4. 各生成物の代謝経路上における関係	48
3.5. カルボン酸 CoA 誘導体の役割	67
4. 考察	74
5. まとめ	90
謝辞	92
文献	94

1. はじめに

自然界には、側鎖にメチル基やメチレン基をもつ、炭素数5の二塩基酸（以下、C₅-分岐二塩基酸とよぶ）が、多数存在している。その主なものの構造を図1に示す。

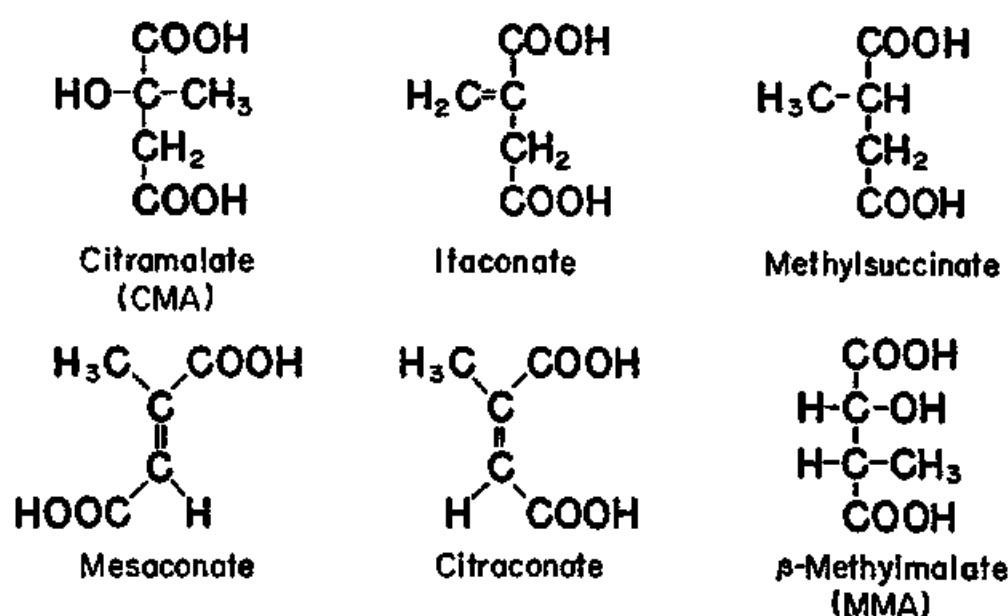


図1. 主な C₅-分岐二塩基酸。MMA は、まだ自然界から単離された例が無い。

これらの C₅-分岐二塩基酸は、様々な生物によって代謝され、しかも、相互に転換されることが知ら

れている。たとえばイタコン酸は、活性化されてイ
タコニル-CoA となった後、加水反応によってチトラ
マリル-CoA に変換されることが、ラットとモルモッ
トの肝ミトコンドリア (1, 2), および Pseudomonas
属の細菌 (3-5) において報告されている。また
メサコン酸 (MSA) は, Pseudomonas fluorescens におい
ては遊離の酸の形で加水反応を受けて L(+)-CMA に
(6), ラットおよびモルモットの肝ミトコンドリア
においてはメサコニル-CoA (MS-CoA) を経てチト
ラマリル-CoA になるといわれる (1, 2)。さらにメ
チルコハク酸は MSA を経て CMA に (7), チトラ
コン酸 (CCA) は加水反応によって D(-)-CMA に
転換される (8, 9) ことが, いずれも Pseudomonas 属の

細菌において見出されている。これらの反応によって生じたCMAは、多くの場合チトラマリル-CoAを経て、アセチル-CoAとピルビン酸とに分解される(1, 2, 4, 5, 10, 11)。以上の諸反応は、いずれもC₅-分岐二塩基酸を、アセチル-CoAとピルビン酸とを経てTCAサイクルに導くという意味において、それらの物質の分解代謝に関与していると考えることができよう。

一方、C₅-分岐二塩基酸を生成する反応についても、幾つかの報告がある。たとえばイタコン酸は、TCAサイクルの中間体であるcis-アコニット酸の脱炭酸反応によって生ずることが、Aspergillus属の菌において知られており(12-14)、またCMAは、ア

セチル-CoA とピルビン酸との縮合反応によって生ずることが、種々の微生物において明らかにされている(10,15-19)。さらに、健康人の尿にはメチルクエン酸が含まれるが、これは、腸内細菌によって作られた分岐鎖脂肪酸が、 ω -酸化と、それに引き続いて β -酸化を受けた結果、生じたものであろうといわれる(20)。このほか、炭素数は5ではないが、プロピオン酸血症の患者におけるメチルクエン酸の生成も、類似の例として挙げてよいであろう。この病気は、プロピオン酸の代謝系に欠陥があるために生ずるもので、この患者に $[^{14}\text{C}]$ プロピオン酸を静脈注射すると、主生成物として $[^{14}\text{C}]$ メチルクエン酸が、大量に尿中に排泄されるという(21)。このカルボン酸

の生成機構としては、プロピオニル-CoA とオキサロ酢酸との縮合反応、および、メチルオキサロ酢酸（後に述べるような反応によって生成する MMA から導かれる）とアセチル-CoA との縮合反応、の2つの可能性が想定されている。

C₅-分岐二塩基酸の生成と分解とを、連続した代謝経路の中で明らかにした最も見事な例は、Barkerらの、グルタミン酸の嫌氣的分解系(22)に見られる。彼らによれば、Clostridium tetanomorphum は、グルタミン酸を、β-メチルアスパラギン酸、MSA、およびCMAを経て、最終的に酢酸とピルビン酸とに分解するという。この反応経路は、現在のところ、C₅-分岐二塩基酸の生理的役割を明らかにした唯一の例で

あるといつてよい。なお、この経路における CMA の開裂反応は、CoA が関与していない点で、先に述べた反応と異なっている。最近、この反応を触媒する酵素にはパントテン酸が含まれ、活性型酵素では、その SH 基にアセチル基が共有結合していること、そして反応は、まず CMA がこのアセチル基と交換し、次いでこの CMA が開裂してピルビン酸が脱離するという機構によって起こることが明らかにされた(23)。

以上に述べたように、C5-分岐二塩基酸の代謝については、これまでに様々の知見が蓄積されてきた。その結果、図 1 に示したもののうち、はじめの 5 つの二塩基酸は、代謝地図の中に位置づけることが既

に可能になっている。一方、図1の最後に示したもう1つの二塩基酸、MMAは、CMAの幾何異性体に相当し、その構造上の類縁性からみて、やはり生物によって何らかの代謝反応を受けることが期待される。それにもかかわらず、この二塩基酸は、これまで自然界から単離されたことが無く、その代謝についても全く研究されていなかった。このものに関する生化学的研究としては、LeBelが、ある種のカビによって、CCAから左旋性MMAが生ずることを報告している例(24)があるのみである。

Korkes は、1956年に発表された総説(25)の中で、プロピオニル-CoA とグリオキシル酸との α -縮合によってMMAが生成し、さらにこれがCMAに転換さ

れるという代謝経路が，生物界に存在する可能性を指摘した。この，プロピオニル-CoA とグリオキシル酸とを基質とする縮合反応は，1962年に Ayl らのグループにより，はじめて研究された。彼らは大腸菌の無細胞抽出液を用いて反応を行なわせ，生成物として MMA ではなく， α -ヒドロキシグルタル酸 (HGA) を同定した。そして，反応機構として両基質の β -縮合を想定した (26, 27)。しかし，彼ら自身も認めているように (28)， β -縮合という反応は，化学的に見てきわめて不自然なものである。実際，彼らも他のアシル-CoA，すなわちアセチル-CoA，ブチリル-CoA，およびバレリル-CoA とグリオキシル酸との縮合反応は α -縮合であることを見出し，それぞれ対

応する生成物としてリンゴ酸， β -エチルリンゴ酸，および β -プロピルリンゴ酸を同定している（29-31）。彼らはまた，CMAを二次的な生成物として同定し（32），これはHGAから炭素鎖のつなぎ替え（"two-carbon shift"）によって生成したものであると主張した（33）。しかし，提出された実験的証拠は，十分なものとはいえない。

一方，著者らの研究室では，従来よりC₅-分岐二塩基酸の代謝に関する研究が行なわれており，MMAの代謝についても興味をもたれていた。そこで，プロピオニル-CoAとグリオキシル酸との縮合生成物は，Korkesの言うようにMMA

なのではないかという立場から，この縮合反応に関する研究が開始された。Nakano らはまず，土壤中より，MMA を炭素源として利用できる細菌を分離した(34)。この菌(恐らく Bacillus circulans であろうとされているが，本論文では単に“土壌菌”と呼ぶことにする)は，MMA の4種の立体異性体のうち，少なくとも D-および L-threo 型と D-erythro 型の3種の異性体を利用できる(35)ほか，種々の C₅-分岐二塩基酸を非適応的に代謝し得る一方，グルコースは利用できないという特徴をもっている。この菌の無細胞抽出液を用いた実験により，MMA の分解反応として，(i) 酸化的脱炭酸による α -ケト酪酸の生

成反応 (34), (ii) erythro 型異性体から $CC A$ を経て $D(-)-CMA$ を生成する反応 (36), (iii) D -threo 型異性体から $CC A$ を経て $D(-)-CMA$ に至る反応 (35), および (iv) L -threo 型異性体から $MS A$ を経て $L(+)-CMA$ に至る反応 (35) が見出された。また $L-CMA$ は, CoA 誘導体を経てアセチル- Co とピルビン酸とに分解されることが明らかになった (10)。

Nakano らは, この菌の無細胞抽出液を用いてプロピオニル- CoA とグリオキシル酸との α -縮合により $MM A$ が生ずる反応を, はじめて証明した (37)。彼らはまた, 生成物として CMA が得られる場合があることを見出し, これは $MM A$

から二次的に導かれたものであらうと考えた(38)が、十分な実験的証拠を提出するには至らなかった。

さて、Ajl らの主張と Nakano らの主張とは、明らかに対立するものであるが、なぜこのような食い違いが生じたのであらうか。Ajl らは大腸菌、Nakano らは土壌菌を材料として用いているので、上の食い違いは、菌の種類の違いによるものとも考えられる。この点を明らかにする一つの方法は、第三の生物を用いて、問題の縮合反応を行なわせ、その縮合形式を調べてみることであらう。このことに関連して、Porter と Merrett の報告(39)が注目された。彼らによれば、

HGA を光合成細菌 Rhodospirillum rubrum の無細胞抽出液と共に インキュベート (incubate) したところ、グリオキシル酸が生じたという。もしこのグリオキシル酸が、HGA の開裂反応によって生じたとするならば、この反応は、Ajl らの主張する β -縮合反応の逆反応であるということになる。すなわち、Porter と Merrett の結果は、この菌における プロピオニル-CoA とグリオキシル酸との縮合反応が、 β -縮合であることを示唆していると考えられる。その意味で、この菌は、“第三の生物” としてきわめて目的に適ったものであるということができよう。

R. rubrum は、紅色非イオウ性光合成細菌と呼

ばれる一群の細菌の1つで、この群の他の菌と同様、種々の有機酸やアミノ酸をはじめとする有機物の代謝能力がきわめて高いのが特徴であり、最近では、その性質に着目して、この菌を汚水処理に利用しようという試みがなされているほどである。この菌の有機酸代謝は古くから研究されてきたが、酢酸からのグルタミン酸の生合成機構が、既知の反応経路では説明がつかないこと(40)、また炭素源として酢酸を利用できるにもかかわらず、グリオキシル酸サイクルの活性が見出されないこと(41)などの点から、未知の代謝経路が存在している可能性が指摘されている。また、この菌には、 C_5 -分岐二塩基

酸が関係する反応として、アセチル-CoA とピルビン酸とから CMA を生成する反応 (16, 17), および Barker らが明らかにしたものと同様のグルタミン酸分解経路 (42) が存在することが知られている。このようなことから考えると、この菌におけるプロピオニル-CoA とグリオキシル酸との縮合反応は、単に先に述べた縮合形式の面からだけでなく、中間代謝における意義という面からも注目に値すると思われる。

以上のような立場から著者は、R. rubrum にもプロピオニル-CoA とグリオキシル酸との縮合反応の活性が存在するかどうか、存在するとすれば生成物は何か、さらに、その生成物はその

後、どのように代謝されるのか、という点に興味をもち、この菌を用いて上の縮合反応に関する研究を行なった。その結果、縮合生成物は土壌菌の場合と同様にMMAであること、さらにこのMMAは、CoA誘導体の形で生成し、MS-CoAおよびMSAを経てCMAに転換されることを示す知見を得たので、ここに報告する。

2. 実験材料および実験方法

2.1. 菌の培養

R. rubrum は大阪大学蛋白質研究所の堀尾武一教授より分与された株を用いた。菌株は、肉エキスおよびポリペプトンを含む寒天培地を用いて、光照射下に深部培養した後、4°Cで保存した。前培養および本培養は、光照射下、28°Cにおいて、静置条件下に行なった。培地の組成は次の通りである(43)。(NH₄)₂SO₄ 1.25 g, DL-リンゴ酸 6.0 g, K₂HPO₄ 900 mg, KH₂PO₄ 600 mg, MgSO₄·7H₂O 200 mg, CaCl₂·2H₂O 75 mg, FeSO₄·7H₂O 11.8 mg, EDTA 20 mg, ビオチン 15 μg, H₃BO₄ 2.8 mg, MnSO₄·4H₂O 2.1 mg, Na₂MoO₄·2H₂O 0.75 mg, ZnSO₄·7H₂O 0.24 mg, Cu(NO₃)₂·3H₂O

0.04 mg, 全容 1 l. この溶液を, NaOH を用いて pH 6.8~7.0 に合わせ, 培地として使用した。寒天培地の菌を, まず約 20 ml の培地に移して試験管内で 72 時間予備培養し, これを新しい培地に移して 24 時間前培養を行ない, さらに新しい培地に移して 48 時間本培養を行なった。前培養と本培養には Roux の培養びんを用い, いずれの場合にも, びんの首の部分まで培地を満たし, 綿栓を用いてシールした。予備培養から前培養へ, および前培養から本培養への接種量は, 新しい培地に対して 5% とした。以上の条件下において培地 1 l 当りの収量は, 湿重量にして約 3 g であった。

Clostridium tetanomorphum ATCC 3606 は, Barker らの方法(44)に従い, グルタミン酸を炭素源として培養した。

2.2. 無細胞抽出液の調製

以上のようにして培養した R. rubrum の細胞を遠心分離によって集め, 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) を用いて 2 回洗浄した。これを, 湿重量の 2 倍容の同緩衝液に懸濁し, 大岳製作所製音波破砕器を用いて, 氷冷下に 20 KHz で 3 分間, 破砕した。15,000 × g で 15 分間遠心した後, 得られた上清を無細胞抽出液として実験に供した。必要な場合には, これを Sephadex G-50 のカラムに通して低分子物質を除去した後, 酵素反応に用

いた。

C. tetanomorphum の無細胞抽出液は, Barkerらの方法(44)に従って調製した。

2.3. 試薬

[1-¹⁴C]プロピオン酸ナトリウム(比活性 19.5 mCi/mole)は, 第一化学薬品より購入した。ATP および NADH は協和発酵より, CoA (リチウム塩) および乳酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.27] (比活性 300 国際単位/mg) は Boehringer 社より, それぞれ入手した。Tris およびグリオキシル酸ナトリウムは Sigma 社, Sephadex G-10 および G-50 は Pharmacia 社, また MSA, CCA, および乳酸亜鉛は 半井化学より, それぞれ購入した。

DL-CMA は, Barker の方法 (45) に従ってアセト酢酸エチルと KCN から, MMA は, Nakano らの方法 (34) に従ってプロピオン酸エチルとシュウ酸ジエチルから, それぞれ化学合成した。その他の試薬は, すべて市販品の最高純度のものを使用した。

2.4. 反応条件

標準反応液は全容 1 ml 中に次の諸成分を含む。
[1- 14 C] プロピオン酸ナトリウム 50 nmol (1 μ Ci),
CoA (リチウム塩) 0.5 μ mol, ATP (2 ナトリウム塩) 15 μ mol, グリオキシル酸ナトリウム 10 μ mol, $MgCl_2$ 5 μ mol, $MnCl_2$ 0.5 μ mol, 2-メルカプトエタノール 7 μ mol, Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5)

50 μ mol, および酵素。反応は 30°C で 1 時間行な
れた。

2.5. 反応生成物の分析

反応後, メタノール 3 ml を添加して蛋白質を
変性させ, 生じた沈殿を遠心分離によって除去
した。得られた上清を Dowex 50 (H^+) のカラム (φ
5 mm × 15 cm) に通してカチオンを除いた後, 減
圧下に 35°C で蒸発乾固させ, 残渣に含まれる放
射性カルボン酸を, ペーパークロマトグラフィー
— およびガスクロマトグラフィー — によって分析
した。

ペーパークロマトグラフィーは, 東洋濾紙 No
50 を用い, 上昇法によって行なった。使用した

溶媒系は、次の6種類である。(A) n -ブタノール-酢酸-水 (4:1:1), (B) エーテル-ベンゼン-ギ酸-水 (21:9:7:2), (C) 酢酸イソアミル-酢酸-水 (11:2:1), (D) 2-エチルブタノール-5 M ギ酸 (2:3), (E) n -アミルアルコール-5 M ギ酸 (1:1), (F) 95% エタノール-28% アمونニア水-水 (8:1:1)。濾紙上の放射活性は、ラジオクロマトスキャナー (Nuclear-Chicago 社製アウチグラフⅢ型) を用いて検出した。カルボン酸の標準試料は、分析試料と同時に展開した後、0.04% ブロムクレゾールグリーンのエタノール溶液を噴霧し、青地に黄色のスポットとして検出した。

ガスクロマトグラフィーは、ジアゾメタンを

用いてカルボン酸をメチルエステル化(46)した後、行なった。使用したクロマトグラフは島津製作所製GC-5A型、固定相は15%ジエチレンジリコールコハク酸ポリエステル、担体はShimalit Wである。カラムとしては、内径4mm、全長1.5mのがラス製のものを使用した。検出器は熱伝導度型を用い、キャリアガスは窒素(流量45ml/min)、カラム温度は150°Cとした。放射活性は、ラジオガスクロマトグラフィーの場合には、クロマトグラフに連結した島津製作所製RID-2E型ラジオアイソトープ検出器によって検出した。放射能を正確に測定する必要がある場合には、流出してくるカルボン酸メチルエステルを、

氷冷した U 字状ガラス管を用いて分取し，液体シンチレーションカウンターによって計数した。この場合，リンゴ酸メチルエステルを内部標準として一定量添加し，そのマスピークの面積を基準として，得られた放射活性の値を補正した。

2.6. 放射活性の測定

放射活性の定量的測定は，Beckman 社製 LS-230 液体シンチレーションカウンターを用いて行なった。シンチレーターとしては，水溶性物質の測定には Bray のシンチレーター (47) を使用し，有機酸のメチルエステルおよび濾紙上の放射活性を測定する場合には，0.4% 2,5-diphenyloxazole と 0.01% 1,4-bis[2-(5-phenyloxazolyl)]benzene のトルエン

溶液（トルエンシンチレーター）を使用した。

2.7.蛋白質の定量

酵素蛋白の定量は，Lowryらの方法（48）により，牛血清アルブミンを標準として行なった。

3. 実験結果

3.1. 反応生成物の同定

[^{14}C]プロピオン酸とグリオキシル酸とを, ATP, CoA, Mg^{2+} , および Mn^{2+} の存在下に, *R. rubrum* の無細胞抽出液と共にインキュベート (incubate) した。反応後, 生成した放射性カルボン酸を, まずペーパークロマトグラフィーによって分析した。図2は, 展開溶媒として溶媒系 (A) = n-ブタノール-酢酸-水 (4:1:1) を用いた場合のクロマトグラムである。

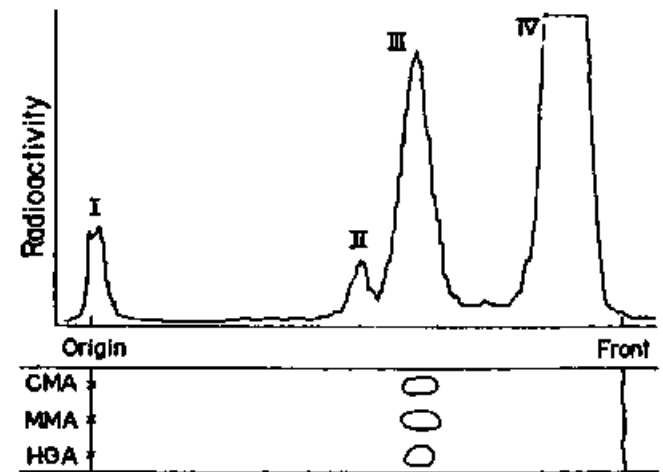


図2. 反応生成物のペーパークロマトグラム。反応条件は, 「実験材料および実験方法」に述べた通りである。上の図は放射能の分布を, 下の図は標準試料のスポットの位置を示す。展開溶媒としては (A) を用いた。

4つの放射能のピーク（画分Ⅰ-Ⅳ）が見出され
そのうち画分Ⅲが，CMA，MMA，およびH
GAと同じ R_f 値を示した。

溶媒系(A)ではCMAおよびMMAと，HGA
とを区別できないので，画分Ⅲを水で濾紙から
抽出し，溶媒系(B)=エーテル-ベンゼン-ギ酸-水（
21:9:7:2）を用いて，再び展開した。その結果

図3に示すように，
単一の放射能のピー
クが見られ，その R_f
値はCMAおよびM
MAに一致し，HGA
とは異なっていた。

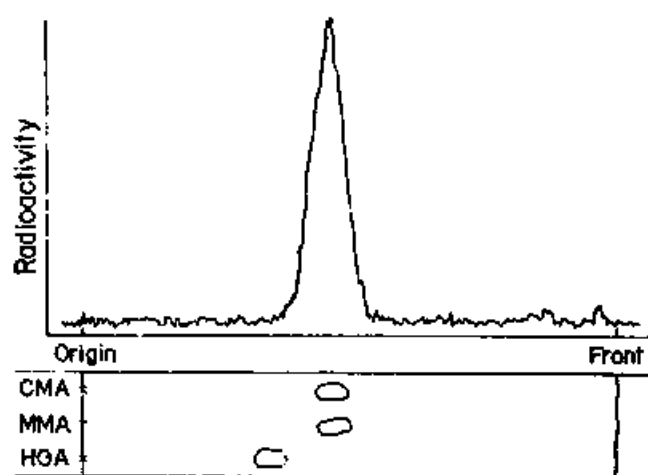


図3. 画分Ⅲのペーパークロマトグラム。図2の画分Ⅲを水で抽出し，溶媒系(B)を用いて再展開した。データの表示法は図2と同じである。

なお、画分Ⅲへの放射能の取込みの最高値は、加えた $[^{14}\text{C}]$ プロピオン酸の13%であった。

CMAとMMAとは、ペーパークロマトグラフィーでは分離することができなかったのので、ラジオガスクロマトグラフィーによる分析を試みた。図4は、画分Ⅲのメチルエステルのクロ

マトグラムを示している。2つの放射能のピーク（化合物Xおよび

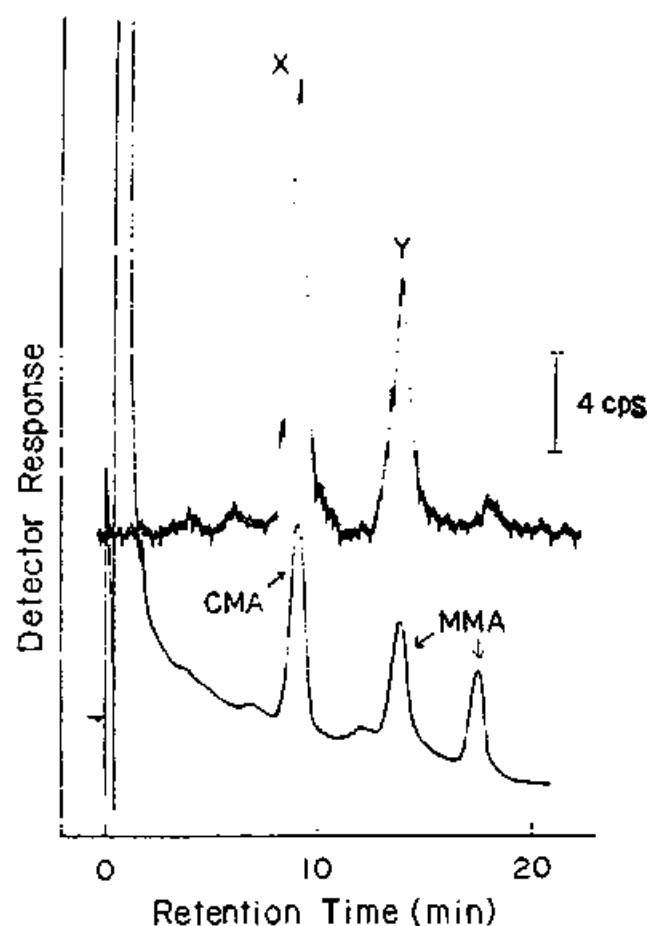


図4. 画分Ⅲのラジオガスクロマトグラム。画分Ⅲを、標準試料のCMAおよびMMAと混合し、ジアゾメタンを用いてメチルエステルとした後、分析した。上の図は放射能、下の図はマスのクロマトグラムを示す。

Y)が見出され、CMA、および2つのMMAのピークのうち保持時間の小さい方のピークに一致していた。

MMAの2つのピークは、2種のジアステレオマーに由来すると考えられる。そこで、それぞれのジアステレオマーが、どちらのピークに対応するかを調べるため、水酸化バリウムを用いるIzumiらの分別沈殿法(49)によって、両者を分離した。まずMMA 9.4gを蒸留水50 mlに溶かし、10%水酸化バリウム水溶液を加えてpHを8とした後、0°Cに一夜放置した。生じた沈殿を分離し、熱水で洗浄し、乾燥させた。この沈殿部分のMMAをメチルエステル化して、ガスフ

ロマトグラフィーにかけたところ、MMAの標準試料の、保持時間の小さい方のピークに一致した。また上清について同様に分析したところ、保持時間の大きい方のピークの割合が多くなっていた。沈殿部分には *erythro* 型 MMA が多いと報告されているので、保持時間の小さい方のピークは *erythro* 型、保持時間の大きい方のピークは *threo* 型と考えられる。このことは、 β -エチルリソング酸の *erythro* 型異性体が、*threo* 型異性体よりも保持時間が小さいと報告されていること(50)とも一致している。

XとYとが、それぞれ、CMAおよびMMAであることを、さらに確かめるため、これらを

良結晶性の誘導体に導くことを試みた。

試料としての化合物 X および化合物 Y は、次のようにして調製した。反応生成物を、溶媒系 (A) を用いてペーパークロマトグラフィーにかけ、画分Ⅲを得た。これをメチルエステル化した後、がスクロマトグラフィーにかけ、氷冷した U 字管を用いて、X と Y とを分取した。得られたそれぞれのメチルエステルをアルカリで加水分解し、Dowex 50 (H^+) で処理して遊離の酸を得た。

MMA については、Nakano らの方法 (37) に従って、キミンに転換した。化合物 Y (23,500 cpm) に、担体として MMA 1 g を加え、これに、発煙硫酸 (30% SO_3) 4 ml に尿素 1 g を溶かした溶液

を混合した。この混合物を沸騰水溶液中で1時間加熱した後，冷却し，次いで氷冷した水10 ml中に注いだ。生じたチミンの沈殿を濾過して，水から3回再結晶し，その都度，18-19 呼の試料を採取して，比放射活性を調べた。表1に示すよ

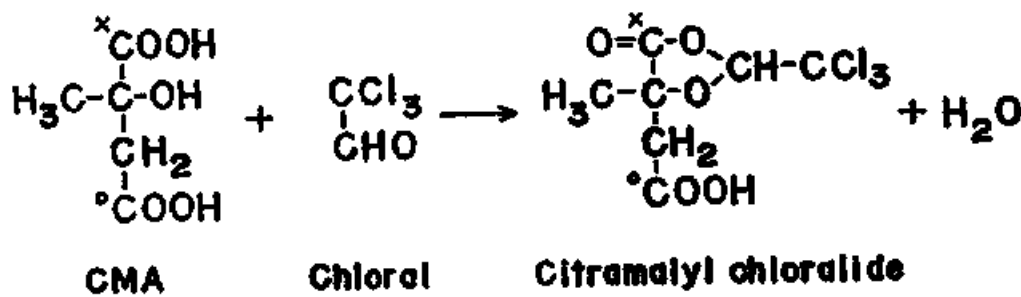
表1. チミンへの転換によるMMAの同定

Recrystallization	Specific radioactivity (cpm/mg)
1st	26.4
2nd	26.1
3rd	27.3

うに，比放射活性はほぼ一定に保たれた。なお3回再結晶後の試料の，紫外部における吸収スペクトルは，既知のチミンのそれとよく一致していた。

CMA については, Katsura がリンゴ酸に対して用いた方法 (51) に従い, クロラリド誘導体に転換した。α-オキシ酸は, クロラールと反応して, 図5のように酸クロラリドを生成すると考

図5. CMA からの酸クロラリドの生成



えられる。化合物 X (22,100 cpm) に, 担体として非放射性 CMA 2 mmol を加え, これに 2 mmol の抱水クロラールおよび 0.5 ml の濃硫酸を加えて混合し, 室温に一夜放置した。生じた固体を 5 回水洗し, 乾燥後, クロロホルム-ヘキサンの系か

ら3回再結晶した。各再結晶毎の比放射活性を10-11 mgの試料について調べると、表2のように、ほぼ一定の値が保たれていることがわかった。

表2. クロラリド誘導体への転換によるCMAの同定

Recrystallization	Specific radioactivity (cpm/mg)
1st	35.1
2nd	37.1
3rd	38.6

元素分析の結果

	C	H	O	Cl
計算値 ($C_7H_7O_5Cl_3$ として)	: 30.30	2.54	28.83	38.33
分析値	: 30.49	2.59	28.67	38.22 (%)

3回再結晶後の試料について元素分析を行なうと、理論値とよく一致した値が得られた。以上の結果は、 $[^{14}C]$ プロピオン酸の放射活性が、erythro-MMAおよびCMAに取込まれたことを示す

ものである。

さて、画分Ⅲ以外にも放射活性をもった化合物が生成していることについては既に述べた(図2; 画分Ⅰ, Ⅱ, Ⅳ)。これら三者への放射能の取込みは、典型的な一例を挙げると、それぞれ3%, 4%, および24%であった。画分Ⅱは、グリオキシル酸を加えない反応系においても、同様に生成することがわかった。画分Ⅰは幾つかの成分を含んでおり、その中には、グリオキシル酸の存在下にのみ生成するものも認められた。この画分をアルカリ処理した後、溶媒系(A)を用いて再びペーパークロマトグラフィーにかけると、原点付近には放射能は見られなくなり、

代って R_f 0.7 付近に放射能が見出された。このことから、画分 I は、カルボン酸の、何らかの誘導体ではないかと考えられた。以後の実験では、誘導体の形で存在しているカルボン酸を、遊離の酸として固定するために、特に触れない限り、反応生成物は、いったんアルカリで処理（ NaOH を加えて pH を 10 とした後、室温に 2 時間放置する）してからペーパークロマトグラフィーにかけた。

次に、画分 IV の分析結果について述べる。反応生成物を、アルカリ処理した後に、溶媒系 (C) を用いてペーパークロマトグラフィーにかけると、図 6 のようなクロマトグラムが得られた。

R_f 0.72 付近に，標準
試料の MSA と一致
して，大きな放射活
性のピーク（画分 VII）
が見出された。この
画分を抽出し，種々
の溶媒系を用いてペ

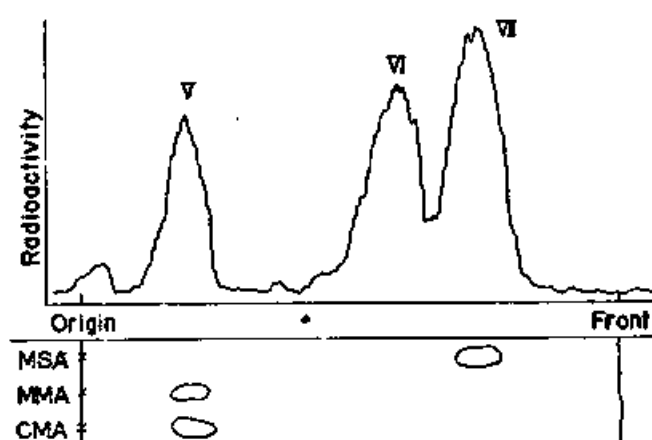


図6. 反応生成物のペーパークロマトグラム。生成物をアルカリ処理した後，溶媒系(C)を用いて展開した。データの表示の方法は図2と同じである。

表3. 種々の溶媒系を用いたペーパークロマトグラフィーにおける画分VIIとMSAの R_f 値

Solvent system	Rf value	
	MSA	fraction VII
A. <i>n</i> -butanol-acetic acid-water (4:1:1)	0.89	0.88
B. ether-benzene-formic acid-water (21:9:7:2)	0.92	0.90
C. isoamyl acetate-acetic acid-water (11:2:1)	0.72	0.72
D. 2-ethylbutanol-5 M formic acid (2:3)	0.87	0.88
E. <i>n</i> -amyl alcohol-5 M formic acid (1:1)	0.85	0.85
F. 95 % ethanol-28 % ammonium hydroxide-water (8:1:1)	0.30	0.31

ーパークロマトグラフィーにかけたところ，表 3 に示すように，いずれの場合にも標準試料の M S A と，ほぼ一致した挙動を示した。さらに明確に同定するため，画分Ⅷ(27,400 cpm)に，非放射性 M S A 200 mg を加え，混合物を水から 3 回再結晶した。各再結晶毎の比放射活性は，表 4 のように，ほぼ一定に保たれていた。以上

表 4. 再結晶法による M S A の同定

Recrystallization	Specific radioactivity (cpm/mg)
1st	143
2nd	138
3rd	140

の結果は，画分Ⅷが M S A であることを示している。

画分Ⅵは，溶媒系(D)を用いてペーパークロマトグラフィーを行なった場合，および高圧濾紙電気泳動(pH 3.7, 70 V/cm)を行なった場合，共にメチルコハク酸とほぼ一致した挙動を示した。しかし，それ以上の構造解析は行なわれなかった。

図2の画分Ⅳは，ここに述べた画分ⅥとⅦとに相当すると考えられる。なお，CMAとMMAとは，画分Ⅴ(R_f 0.18)に相当していた。

3.2. MMAおよびCMAの立体構造

前節において， $[^{14}C]$ プロピオン酸の放射能が，erythro-MMAとCMAとに取込まれていることが示された。両者は，それぞれ二種の光学異性体をもっているので，酵素的に生成したものが

どちらの異性体であるかを次に検討した。方法としては、ブルシンによる光学分割法を用いた。

先に述べた方法によって得た $[^{14}\text{C}] \text{MMA}$ に、担体として非放射性 *erythro*-DL-MMA 1.22 mmol を加えて、蒸留水 4 ml に溶解した。この溶液にブルシン(2水化物) 0.61 mmol を加えて加熱、溶解させ、 0°C に一夜放置した。生じた沈殿と上澄みとを遠心分離し、沈殿は水から1回再結晶した。沈殿および上澄みに、それぞれ 2N NaOH を 1 ml 加え、MMA のブルシン塩を分解した。遊離したブルシンを遠心によって除き、上清をそれぞれ Dowex 50(H^+) で処理して遊離の酸を得、減圧下に蒸発乾固した。これを蒸留水 2 ml に溶解し、

それぞれの画分について，MMAの量をNaOHで
 滴定すると共に，放射活性を測定して，MMA
 の比放射活性を求めた。表5に見られるように，

不溶性（沈殿）画分

表5. $[^{14}\text{C}]$ MMAのブルシンによる光学分割

の比放射活性は分割

Fraction	Specific radioactivity (cpm/mg)
Original	98.3
Insoluble	142
Soluble	81.4

前より上昇しており，

これに対して可溶性

（上澄み）画分のそれは低下していた。Izumiら

によると，ブルシン塩が難溶性であるのは，ery-

thro-MMAの場合，D(+)-型異性体（ $[\alpha]_D^{20} = +9.1^\circ$ (3.7%)

であり，易溶性であるのはL(-)-型（ $[\alpha]_D^{20} = -8.9^\circ$ (

3.7%)）である（49, 52）。著者が分割して得たM

MAは，遊離の形で旋光度を測定するには量が

少なすぎたので、4.5%モリブデン酸アンモニウム存在下で比旋光度が増大する性質(53)を利用して測定してみた。その結果、沈殿画分の見かけの比旋光度は $[\alpha]_{580.5}^{20} = +580^{\circ}$ (0.8%)、上澄み画分のそれは $[\alpha]_{580.5}^{20} = -24.4^{\circ}$ (1.6%)であった。これらの結果は、モリブデン酸アンモニウム存在下で旋光方向が変化しないものとするれば、酵素反応によって生じたMMAがD-型であることを意味している。一方、Nakano(38)は、土壤菌を用いた実験において、同様の反応によって生じたMMAが、 β -メチルリンゴ酸脱水素酵素の基質にならないと報告している。この酵素は、ロイシン生合成に関与する酵素の一つ、 β -イソプロピル

リンゴ酸脱水素酵素 [EC 1.1.1.85] と同一であることが明らかにされており (34), 本来の基質である β -イソプロピルリンゴ酸の場合 (54) と同様に, MMA の場合にも, D-型異性体の脱水素反応を触媒すると考えられる。このことは, 分割実験の結果とは逆に, 得られた MMA が L-型であることを示唆するものである。以上のよう
に, MMA の立体構造については, D と L のどちらであるかを明確にすることはできなかった。

次に CMA についても同様に光学分割を行なった。[^{14}C]CMA に, 0.68 mmol の非放射性 DL-CMA および 0.34 mmol のグルシン (2 水化物) を加え, MMA の場合と同様に処理した。その結果,

表6. [¹⁴C] CMAのグルシンによる光学分割

Fraction	Specific radioactivity (cpm/mg)
Original (DL-CMA)	51.9
Insoluble (rich in L-CMA)	71.0
Soluble (rich in D-CMA)	33.4

表6に示すように、不溶性画分の比放射活性は分割前より高く、可溶性画分のそれは低かった。Barker (45)によれば、沈殿画分には (+)-型が多く含まれるはずであり、実際、旋光度を測定してみると右旋性を示した。 (+)-CMAは L-型であると報告されている (55) ので、得られた CMA は L-型であると考えられる。このことは、後に述べるように、この CMA が、 C. tetanomorphum のチトラマル酸開裂酵素 [EC 4.1.3.22] の基質にな

り得ることからも支持された。

3.3. 基質・補酵素要求性

以上のように、 $[^{14}\text{C}]$ プロピオン酸からの放射活性がMMA, CMAおよびMSAに取込まれることがわかったので、次に、これらの生成に対する基質や補酵素の要求性を調べた。完全系およびそれから各成分を一つずつ除いた系を同時にインキュベートし、生成物を、溶媒系(C)を用いてペーパークロマトグラフィーにかけた。ラジオクロマトスキャナーによってピークの位置を確認した後、MSA, およびCMAとMMAに相当する部分を切り取り、トルエンシンチレーター中に浸して放射活性を測定した。CM

A と MMA とは，この方法では分離できないので，両者の和として定量した。なお，この実験では，無細胞抽出液を Sephadex G-50 のカラムに通し，低分子物質を除いてから，酵素液として用いた。

表7. プロピオン酸から MMA, CMA および MSA を生成する活性の，基質ならびに補酵素に対する要求性。完全系の組成は次の通りである。[1-¹⁴C]プロピオン酸ナトリウム 12 nmol (400,000 cpm)，グリオキシル酸ナトリウム 5 μ mol，ATP (2 ナトリウム塩) 5 μ mol，CoA (リチウム塩) 0.3 μ mol，MgCl₂ 2.5 μ mol，MnCl₂ 0.25 μ mol，2-メルカプトエタノール 2.5 μ mol，Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 15 μ mol，および酵素 (2.2 mg 蛋白質)；全容 0.38 ml。反応は 30°C で 1 時間，行なわせた。

Reaction system	MMA+CMA		MSA	
	cpm	% ^a	cpm	% ^a
Complete	29,400	100	164,000	100
-Glyoxylate	600	1.9	2,800	1.7
-ATP	1,800	6.2	13,900	8.5
-CoA	2,000	6.9	57,400	35.0
Boiled enzyme ^b	0	0	0	0

a. "Complete system" を 100% とした場合の相対値。

b. 酵素液を，あらかじめ沸騰水浴中で 5 分間加熱した。

表 7 に見られるように，グリオキシル酸，A
 TP，CoA のいずれが欠けても，CMA，MMA
 A，MSA の生成は顕著に減少することがわか
 った。酵素溶液をあらかじめ熱処理しておくと，
 活性は全く認められなかった。なお，(CMA
 + MMA) の画分における両者の比は，後に述
 べるように，酵素濃度に依存して変動した。ま
 た CoA を除いた場合にも，MSA がかなり生成
 したが，これは酵素液中に極微量の CoA が混在
 していたためかと思われる。

3.4. 各生成物の代謝経路上における関係

前述の結果は，MMA，CMA，および MSA
 A が，いずれも プロピオニル-CoA とグリオキシ

ル酸とから，酵素的に生成するものであることを示している。これらのカルボン酸の化学構造から考えて，MMAはプロピオニル-CoAとグリオキシル酸との α -縮合によって生じ，CMAはMSAを経て，MMAから二次的に導かれるという反応経路を想定するのが妥当であろう。そこで，これら三者の代謝経路上における相互関係を調べるために，以下の実験を行なった。

上述の酵素反応を繰返し行なってみると，反応生成物中のCMAとMMAの比率が，実験のたびに顕著に変動するのが認められた。その原因を調べた結果，表8に示すように，この現象は酵素濃度と深い関係があることがわかった。

表8. MMA と CMA との相対生成度に及ぼす酵素濃度の影響。反応液の組成は、酵素濃度以外については、表7の場合と同じである。MMA と CMA とは、ガスクロマトグラフィーによって分離し、定量した。

Enzyme preparation	Protein concentration (mg/ml)	Radioactivity incorporated (cpm)		CMA/MMA
		CMA	MMA	
Crude extract	3.2	1,580	3,780	0.42
	1.6	450	4,060	0.11
Sephadex G-50 eluate	4.3	1,950	5,020	0.39
	2.1	630	5,360	0.12
	1.1	0	6,300	0

すなわち、酵素濃度が高いほど CMA の割合が多く、逆に酵素濃度が低いほど MMA の割合が多かった。無細胞抽出液をそのまま反応に用いた場合においても、Sephadex G-50 のカラムを通した酵素溶液を用いた場合においても、同様の結果が得られたので、酵素溶液中の低分子物質が原因であるとは考え難い。

このことを利用して、まず M M A と C M A との関係について検討するために、次のような実験を行なった。無細胞抽出液を Sephadex G-50 のカラムに通して、低分子物質を除去した後、一部の溶出液を、コロジオンバッグを用いて濃縮した。カラムからの溶出液を低濃度酵素溶液としコロジオンバッグによる濃縮液を高濃度酵素溶液として、実験に用いた。実験は二段階に分けて行なった。まず低酵素濃度および高酵素濃度で、第一次反応を 30 分間行なわせ、この段階でそれぞれの反応液を二等分し、一方は反応を止め、他方は低濃度または高濃度の新しい酵素液を加えた後、セミカルバジド存在下に、第二次

反応としてさらに45分間反応させた。酵素濃度の組合せを，低→低，低→高，高→高の三通り

表9. 低酵素濃度におけるMMAの蓄積と高酵素濃度におけるCMAの生成。反応は二段階に分けて行なわせた。第一次反応の反応液の組成は次の通りである。[¹⁴C]プロピオン酸ナトリウム 25 nmol (0.5 μ Ci)，グリオキシル酸ナトリウム 5 μ mol，ATP (2ナトリウム塩) 3 μ mol，CoA (リチウム塩) 0.3 μ mol，MgCl₂ 2 μ mol，MnCl₂ 0.2 μ mol，2-メルカプトエタノール 2.8 μ mol，Tris-HCl緩衝液 (pH 7.5) 20 μ mol，および酵素；全容 0.4 ml。30分間反応させた後，液を二等分し，一方は反応を止め，他方は10 μ molのセミカルバジド（直前に中和したもの）と新しい酵素液とを加え，さらに45分間第二次反応を行なわせた（液容 0.5 ml）。生じたMMAとCMAとをガスクロマトグラフィーによって分取し，放射活性を測定した。

Experiment	Reaction	Protein Concentration (mg/ml)	Radioactivity incorporated (cpm)	
			MMA	CMA
I	1st	4.1	7,160	0
	2nd	15.2	930	2,250
II	1st	4.1	5,390	0
	2nd	4.1	2,050	0
III	1st	17.0	3,300	4,100
	2nd	11.3	1,470	4,730

に設定して反応させた後，それぞれの場合の MA および CMA の生成量を調べた。

表 9 に見られるように，低酵素濃度での第一次反応では CMA は生成せず， MA のみが蓄積した（実験 I，II）。この MA は，高酵素濃度で第二次反応を行なわせると減少し， CMA が生成した（実験 I）。低酵素濃度で第二次反応を行なわせた場合には， CMA の生成は見られなかった（実験 II）。一方，第一次反応を高酵素濃度で行なわせると，この段階ですでに CMA の生成が MA のそれを上回った（実験 III）。なお，セミカルバジドは，グリオキシル酸をセミカルバゾンとして捕捉することにより，

第二次反応において新たな縮合反応が起こるのを防ぐために加えたものである。別の実験によって、上記の条件下では、この縮合反応はほぼ完全に阻害されることが確認された。したがって、高酵素濃度における第二次反応によって生成したCMAは、de novoの縮合反応によって生じたものではないと考えられる。以上の結果は、CMAがMMAから二次的に導かれると考えれば、容易に説明することができる。また第二次反応において、CMAの生成量以上にMMAが減少しているのが見られたが、この原因としては、MMAがCMA以外のものに転換された可能性や、再びプロピオニル-CoAとグリオキシル

酸とに開裂した可能性などが考えられる。

CMAがMMAから生
じることさらに確かめ
るため、次に両者の生成
の時間変化を調べた。そ

の結果、図7に示すよう
に、MMAは明らかにC
MAに先立って生成する
こと、さらに、CMAは
MMAの減少と平行して
生成することがわかった。

この結果は、MMAがC
MAの前駆体であること

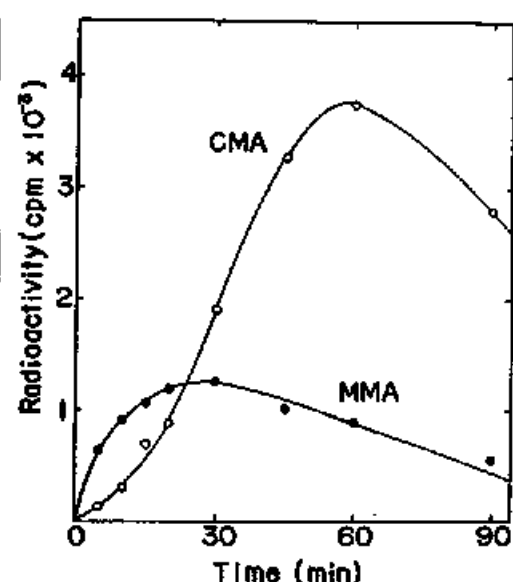


図7. CMAおよびMMAの生成の時間的経過。反応開始時の反応液は全容4.0ml中に次の諸成分を含む。 $[^{14}\text{C}]$ プロピオン酸ナトリウム 100 μmol (2 μCi), グリоксиラ酸ナトリウム 40 μmol , ATP (2ナトリウム塩) 45 μmol , CoA (リチウム塩) 2.4 μmol , MgCl_2 20 μmol , MnCl_2 2 μmol , 2-メルカプトエタノール 28 μmol , Tris-HCl 緩衝液 (pH 7.5) 125 μmol , および酵素 (85.5 mg蛋白質)。経時的に0.5mlの反応液を採取し、MMAおよびCMAを表9の場合と同様の方法で分析した。○, CMA; ●, MMA。

を強く示唆するものである。

さて，CMAがMMAを経て生成するとなれば，最も考えやすい反応機構は，脱水および加水反応が連続して起こることによる，水酸基の移動である。この仮定が正しいとすれば，図8からわかるように，プロピオン酸のカルボキシル基に存在した ^{14}C は，CMAの α -カルボキシル

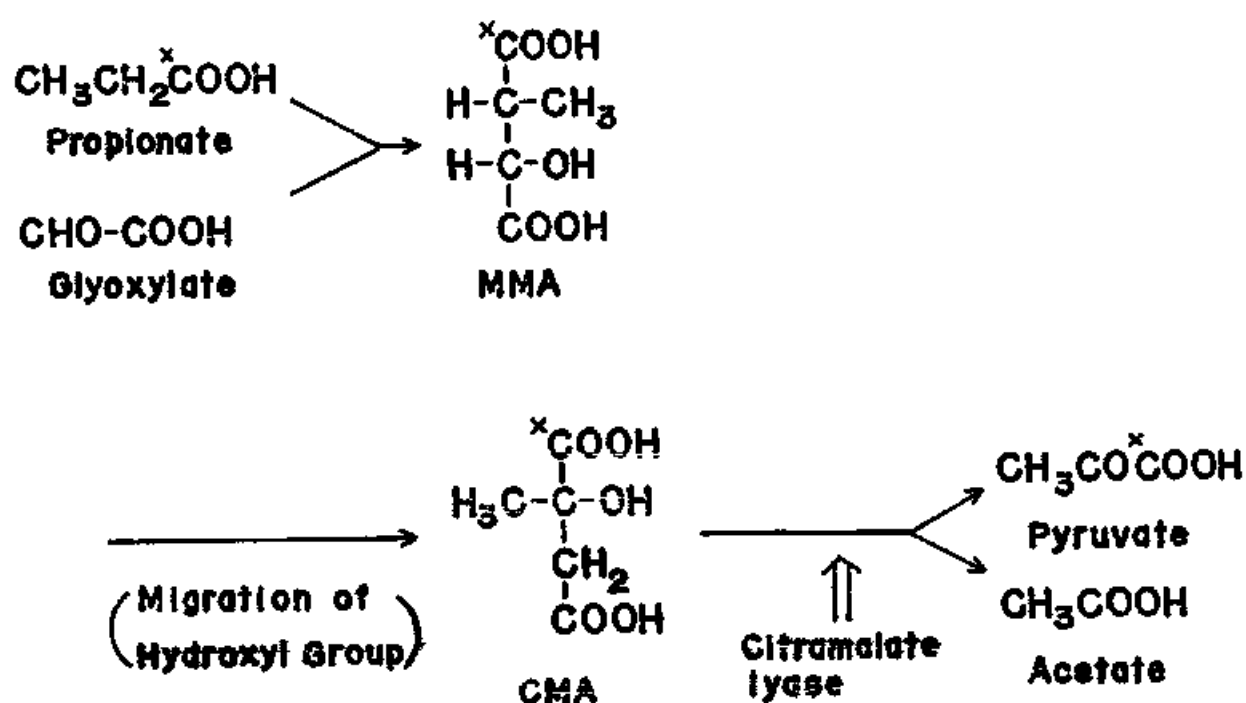


図8. CMAの生成経路と開裂反応との関係。Xは ^{14}C で標識された炭素原子を示す。

基に取込まれるはずである。

Barkerらによれば，グルタミン酸を炭素源として生育した C. tetanomorphum は，L-CMA を特異的に酢酸とピルビン酸とに開裂させる酵素，チトラマル酸開裂酵素をもっているという (55)。先に述べたように，プロピオン酸から生じた CM A は L-型と考えられるので，この酵素によって開裂反応を受けるはずである。そして，その際，CMA の α -カルボキシル基は，ピルビン酸のカルボキシル基になるはずである。したがって，CMA の生成経路が予想の通りであるならば，ピルビン酸の側に，プロピオン酸由来の ^{14}C が回収されるはずである (図 8)。そこで，R. rubrum

の無細胞抽出液によって酵素的に生じた $[^{14}\text{C}]$ CMA に, C. tetanomorphum の無細胞抽出液を作用させてみた。

$[1-^{14}\text{C}]$ プロピオン酸
5 μCi を用いて, 高酵素濃度下に縮合反応を行なわせ, 溶媒系

(A)を用いたペーパークロマトグラフィーにより, 画分Ⅲを分離した。これを基質とし, C. tetanomorphum の無細胞抽出液を加

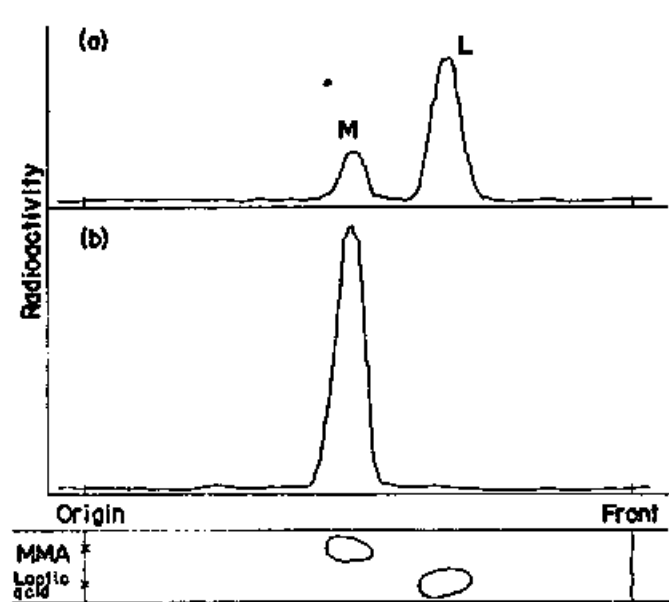


図9. C. tetanomorphum の無細胞抽出液による CMA 開裂反応の生成物の分析。開裂反応の反応液の組成は次の通りである。画分Ⅲ ($[^{14}\text{C}]$ CMA と $[^{14}\text{C}]$ MMA の混合物; 300,000 cpm), MgCl_2 1 μmol , 乳酸脱水素酵素 25 μg (7.5 国際単位), NADH 10 μmol , Tris- HCOOH 緩衝液 (pH 7.4) 50 μmol , および (a) では C. tetanomorphum の無細胞抽出液, (b) では 5 分間沸騰水浴中で加熱した抽出液 (5.3 μg 蛋白質); 全容 1.0 ml 。反応後, 生成物を, 溶媒系 (B) を用いてペーパークロマトグラフィーにかけた。

えてインキュベートした。ピルビン酸は、後の分析を容易にするため、乳酸脱水素酵素を作用させて乳酸に転換した。反応後、生成物を、溶媒系(B)を用いてペーパークロマトグラフィーにかけたところ、2つの放射性カルボン酸、MとLが見出された(図9(a))。Mは標準試料の MMA と R_f 値が一致し、ラジオガスクロマトグラフィーで分析したところ、ほぼ単一の MMA であることがわかった(図10(a))。

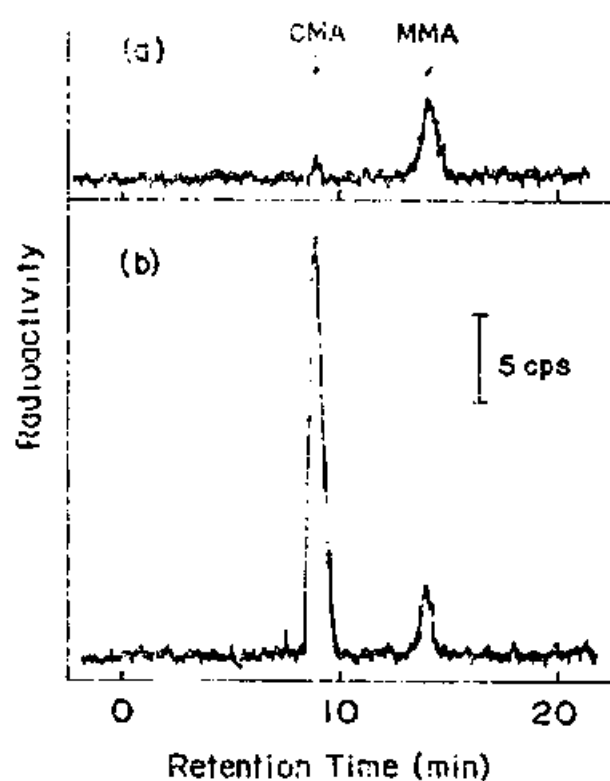


図10. カルボン酸Mのラジオガスクロマトグラム。(a)・(b)はそれぞれ、図9の(a)・(b)に対応する。

一方、カルボン酸Lは、
乳酸と同一の R_f 値を示し

た。熱処理した C. tetanomorphum の無細胞抽出液を反応に用いた場合には, L のピークは全く見られず(図 9(b)), カルボン酸 M の中の CMA は分解されていないことがわかった(図 10(b))。

次に L が乳酸であることをさらに確かめるため, これを水で濾紙から抽出した後, 市販品の乳酸亜鉛 300 mg を加えて, 水から 3 回再結晶した。各再結晶毎の比放射活性を, Nuclear-Chicago 社製ガスフローカウンターを用いて求めたところ, 表 10 のようにほぼ一定の値が保たれた。以上の結果は, R. rubrum の無細胞

Recrystallization	Specific radioactivity (cpm/mg)
1st	85.4
2nd	76.8
3rd	86.2

表 10. [^{14}C] 乳酸亜鉛の再結晶.

胞抽出液によって生成した $[^{14}\text{C}] \text{CMA}$ が L-型であったことを裏付けると共に、その放射能が α -カルボキシル基に存在していたことを示すものであり、 CMA が、水酸基の移動によって MMA から生ずるという推定を支持するものである。

MMA が脱水反応を受けた場合、 α, β -炭素間に二重結合をもつ中間体が生ずることになる。 MSA は、この構造に当てはまるカルボン酸であるので、次に、 MSA が CMA 生成の中間体であるかどうかを知るための実験を行なった。

まず、 CMA 生成反応系に非放射性 MSA を共存させた場合の、放射能に対する希釈効果を調べた。

非放射性 MSA $10 \mu\text{mol}$ の存在下または非存在下に反

応させた後，表Ⅶの実験の場合と同様の方法で，（
 MMA + CMA）およびMSAの画分の放射活性を
 測定した。次いでガスクロマトグラフィーによって
 MMAとCMAとを分取し，それぞれの放射活性を
 調べ，その存在比から，最初の（MMA + CMA）
 の画分中での各々の量を求めた。その結果，表Ⅱに

表Ⅱ. MSAによる放射能の希釈効果。

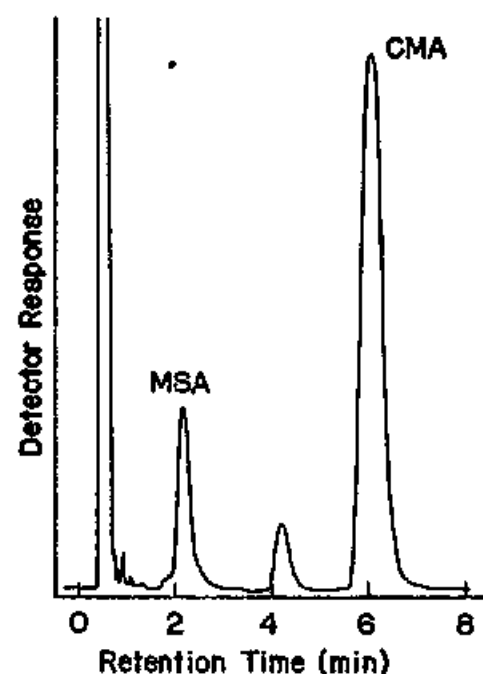
Addition	Carboxylic acid formed (cpm)		
	MMA	MSA	CMA
None	8,200	30,400	13,500
MSA	16,200	60,500	8,400

見られるように，MSAを加えておくと，CMAへ
 の放射能の取込みが減少し，MSAへの取込み増加
 した。このことは，MSAによって放射能が捕捉さ
 れたことを示すものと考えられ，MSAがCMAの

前駆体であるとするれば、よく説明できる結果である。
また M S A の添加によって、M M A の蓄積量も増加したが、このことは、M M A が M S A の前駆体であり、M S A の量的増大によって、M M A \rightarrow M S A の転換が阻害を受けたと解釈することができる。また、三種のカルボン酸全体への放射能の取込みが M S A 添加によって増加しているのは、後に述べるような C M A 以降の経路に流れていた放射能が、M S A によって捕捉されたためと考えることができる。本実験の結果は、M S A が C M A 生成の中間体であることを示唆するものである。なお希釈実験としては、M S A の代りに M M A を用いた実験も行なったが、この場合には、何らの効果も認められなかった。

さて、MSAがCMAの前駆体であるならば、MSAを無細胞抽出液と共にインキュベートした場合、CMAが生成するはずである。

実際、Sephadex G-50カラムで脱塩した酵素液を用いて反応を行なわせ、生成物をガスクロマトグラフィーで分析してみ



ると、図11に見られるように、CMAに一致するピークが見出された。MSAを含まない系、および熱処理した酵素液を用いた系では、このピークは見出されなかった。MSA

図11. MSAからのCMAの酵素的生成。反応液は全容0.4ml中に次の諸成分を含む。MSA(2ナトリウム塩) 20 μ mol, Tris-HCl緩衝液(pH7.5) 20 μ mol, および酵素(2.5mg蛋白質; Sephadex G-50カラムを通して低分子物質を除去したもの)。反応は30°Cで1時間行なわれた。生成物をメチルエステル化してガスクロマトグラフィーにかけ、水素炎イオン化検出器を用いて検出した。

と C M A との間に見られる小さなピークは、ジアゾメタンを用いて試料をメチルエステル化する時に、副産物として C M A から生じたものと思われる。上の結果は、 $[^{14}\text{C}]$ プロピオン酸から酵素的に調製した $[^{14}\text{C}]$ M S A を用いて、トレーサー実験を行なった場合にも再現された。この実験において M M A の生成は見られず、A T P および CoA を反応系に加えておいても、やはり M M A は生成しなかった。また M M A を基質としてインキュベートした場合、M S A や C M A の生成は見られず、C C A を基質とした場合にも、M M A や C M A の生成は見られなかった。

M S A から C M A を生ずる加水反応は、一般にメサコナーゼ [EC 4.2.1.34] によって触媒される。こ

の酵素は Fe^{2+} によって活性化されることが知られている (6, 56) ので, CMA 生成系に及ぼすこのイオンの効果を調べてみた。表 12 に示すように, 通常の

表 12. MMA と CMA の生成に対する Fe^{2+} の効果。

Addition	Radioactivity incorporated (cpm)		CMA/MMA
	MMA	CMA	
None	1,580	5,390	3.4
Fe^{2+} (1 mM)	1,750	9,030	5.2
Fe^{2+} (1 mM), o-phenanthroline (5 mM)	1,300	3,470	2.7
Fe^{2+} (10 mM), o-phenanthroline (5 mM)	1,530	8,390	5.5

CMA 生成反応系に 1 mM のモール塩を加えて反応を行なわせると, CMA の MMA に対する相対的な生成量は, コントロールに比して増加し, この効果は, Fe^{2+} のキレート剤である o-フェナントロリン (5 mM) の添加によって打消された。 Fe^{2+} の濃度を 10 mM にする

と、5 mM o-フェナントロリンの効果に打勝って、CMAの生成量は再び増加した。データは示していないが、キレート剤として α, α' -ジピリジルを用い、MMA, MSA, およびCMAの三者の生成量を調べた実験では、 Fe^{2+} の添加によってCMAの相対的生成量が増すと共に、MMAのみならずMSAも、相対的に蓄積量が減少するという傾向が見られた。また、この Fe^{2+} の効果は α, α' -ジピリジルによって打消されたが、 α, α' -ジピリジルのみを添加した場合には、コントロールと比べて大きな差は見られなかった。なお、 $[^{14}C]$ MSAからの $[^{14}C]$ CMAの生成を調べた実験においても、 Fe^{2+} による活性化効果が認められた。

3.5. カルボン酸 CoA 誘導体の役割

表 7 で示したように， $MM A$ ， $MS A$ ，および $CM A$ の生成には， ATP と CoA とが要求される。すなわちプロピオン酸は，プロピオニル- CoA となった後に，グリオキシル酸と縮合するものと考えられる。この場合，縮合生成物としては，遊離の $MM A$ と， $MM A$ の CoA 誘導体の両方が考え得る。先に述べたように， $CM A$ 生成反応系に遊離の $MM A$ を加えておいた場合，放射能に対する希釈効果は認められなかったので，遊離の $MM A$ が $CM A$ 生成の中間体であるとは考えにくい。したがって， $MM A$ は，実際には CoA 誘導体として生成し，そのままの形で $CM A$ に転換されるものと考えられた。

そこで，このことを確かめるため，カルボン酸の

CoA 誘導体を分離し、確認しようと試みた。CoA 誘導体は、アルカリに対して不安定であることが知られているので、図2の画分Iがこれに相当するのではないかという可能性も考えられたが、この画分には、MMA や CMA などを見出すことはできなかった。これは、CoA 誘導体が実際には生成していたとしても、濃縮やペーパークロマトグラフィーの操作の間に分解されてしまうためではないかと考えられた。

そこで、CoA 誘導体と遊離の酸との分子量の違いに着目し、Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィーによって両者を分離することを試みた。通常の条件で反応を行なわせた後、トリクロル酢酸を、終濃度が

12.5% になるように加えて，蛋白質を変性，沈殿させた後，得られた上清をクロマトグラフィーにかけた。図12に，その溶出パターンを示す。2つの放射活性のピーク，ZとWが見られ，それぞれ内部標準として加えた CoA と MSA との溶出ピークにほぼ一

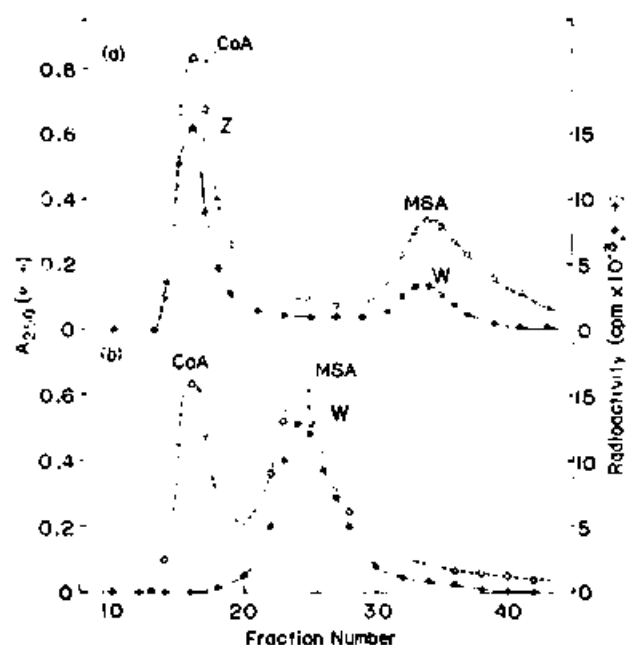


図12. 反応生成物の Sephadex G-10 カラムクロマトグラム。通常の条件(全容0.6 ml)で反応させた後，50%トリクロル酢酸0.2 mlを加えて蛋白質を沈殿させ(終濃度12.5%)，上清を2等分した。一方に(図(a))，蒸留水0.1 mlと0.1 M 酢酸ナトリウム-酢酸緩衝液(pH 4.5)0.3 mlを加えた。内部標準としてMSA 10 μ molとCoA 2 μ molとを加えて，上

記の緩衝液で平衡化した Sephadex G-10 カラム(ϕ 1 cm \times 12 cm)に上層した。上記緩衝液を用いて溶出し，5滴(約0.35 ml)ずつ分画した。他方，(b)では，0.4 mlの試料溶液に6 N KOH 0.1 mlを加えて室温に一夜放置した後，上記緩衝液0.3 mlを加え，(a)と同様にしてクロマトグラフィーを行なった。各画分につき，20 μ lの液を採取して放射活性(●)を測定する一方，0.1 mlを採取して蒸留水3 mlを加えて希釈し，MSAおよびCoAに由来する250 nmにおける吸光度(○)を測定した。

致した(a)。一方、生成物を、いったんアルカリで処理してからクロマトグラフィーを行なった場合には、ピークZは消失し、Wのみが見出された(b)。この場合、内部標準として加えたMSAが、図(a)におけるよりも早く溶出されたが、これは、試料溶液のpHの違いによるものではないかと思われる。ピークZに相当する物質は、アルカリに対する不安定性、およびその溶出位置から、カルボン酸のCoA誘導体であることが示唆された。

図12(a)のピークZおよびWに相当する部分の溶出液を集め、アルカリで処理した後、溶媒系(C)を用いてペーパークロマトグラフィーにかけた(図13)。ピークZからは、MMAとMSAとが検出された(a)。

一方, WからはMSA

のみが見出された(b)。

また, データは示して

いないが, 図12(b)のピ

ークWの部分のペーパ

ークロマトグラムは,

図13(a)とほぼ同じパタ

ーンを示した。なお,

この実験は, 酵素濃度

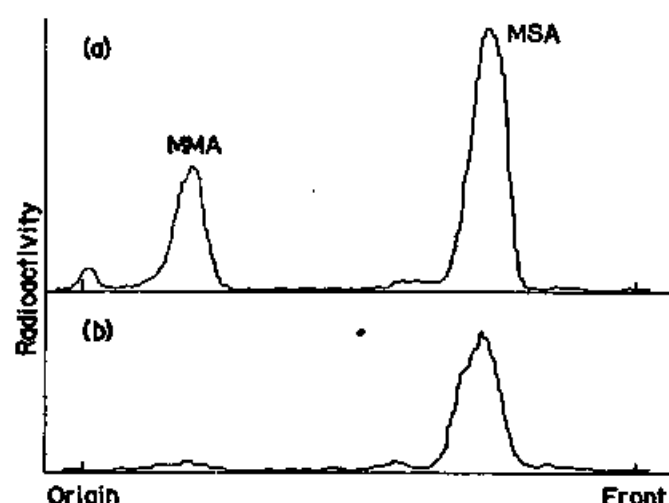


図13. ピークZおよびWに含まれる放射性カルボン酸のペーパークロマトグラム. ピークZ(画分14-20), およびY(画分31-37)の各画分より0.2μずつの液を集め, 含まれる放射性カルボン酸を, 溶媒系(C)を用いてペーパークロマトグラフィーにかけた。(a)はピークZ, (b)はYに含まれるカルボン酸のクロマトグラムを示す。

が比較的低い条件(8.2 mg/ml)で行なったために, C

MAの生成は, 殆ど見られなかった。別の実験で,

酵素濃度を高くして(16.8 mg/ml)反応を行なわせた場

合には, CMAがMMAに比べて大量に生成し, こ

の場合には、生成物の大部分が遊離の酸として存在していた。以上の結果は、MMAはCoA誘導体として、またMSAはCoA誘導体と、恐らくは遊離の酸との両方の形で、CMA生成に関与していることを示唆するものである。

4. 考 察

以上に述べた結果は、プロピオニル-CoA とグリオキシル酸とから、R. rubrum の無細胞抽出液によって、erythro-MMA, L-CMA, およびMSAが酵素的に生成したことを示している。MMAは、その構造からみて、プロピオニル-CoA とグリオキシル酸との α -縮合によって生成したと考えてよいであろう。これは、Nakano らが土壌菌を用いて得た結果(37)と一致している。一方、Ajl らの主張するHGAの生成(26, 27)は全く認められなかった。すでに述べたように、 β -縮合という反応形式は、化学的にみても不自然なものと考えられる。本研究の結果から考えて、かりに α -縮合と β -縮合の両方の反応が自然界に存在して

いるとしても、 α -縮合の方が、少なくともより一般的であろうと思われる。

著者はまた、PorterとMerrettの結果(39)を、彼らの方法に従って追試してみたが、HGAからのグリオキシル酸の生成を認めることはできなかった。彼らの結果がなぜ再現されなかったのかは明らかではないが、 β -縮合の逆反応に相当するということを考えると、この開裂反応もまた、考えにくい反応であるように思われる。

さて、表9および図7の結果は、CMAがMMAから二次的に導かれることを強く示唆している。さらに、CMA分子内のラベルの位置を調べた結果(図9, 10; 表10)、CMAは、水酸基の移動によって

MMA から生成することが示唆された。この反応経路を想定するならば、最も考えやすい機構は、脱水反応と加水反応が連続して起こることであり、その場合、中間体として α, β -炭素間に二重結合をもつカルボン酸が生成することが予想される。反応生成物の一つとして同定された MSA は、この条件を満たす物質である。反応系に MSA を共存させることによって放射能が捕捉されたこと(表 II), MSA から酵素的に CMA が生成するのが認められたこと(図 II), および Fe^{2+} の添加によって、CMA の生成の増加と MSA の蓄積の減少が同時に見られたことは、MSA と CMA とが代謝経路上で隣接した位置にあり、しかも MSA の方が CMA よりも先に生成すると考え

れば、よく説明できる結果である。このことから、
M S A は実際に C M A 生成の中間体であり、上記の
三者は、代謝経路上で $M M A \rightarrow M S A \rightarrow C M A$ の順
序に位置していることが推定された。

一方、M M A を反応系に共存させておいても、放射能に対する希釈効果が見られなかったことから、少なくとも遊離の M M A は、C M A 生成の中間体ではないものと考えられた。このため、実際の縮合生成物は β -メチルマリル-CoA ではないかと考えられたが、実際 Sephadex G-10 カラムクロマトグラフィーの結果(図12,13)は、この推定を支持するものであった。以上の結果をまとめて、次のような反応経路を推定した(図14)。この反応経路は、Korkes の提唱し

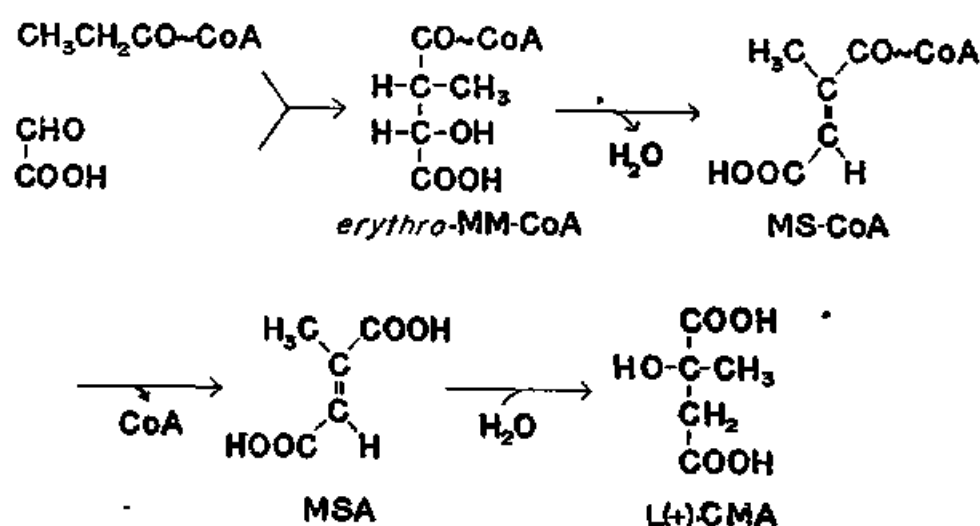


図 14. プロピオニル-CoA とグリオキシル酸 とからの CMA の推定生成経路. MM-CoA = β -メチルマリル-CoA; MS-CoA = メサコニル-CoA.

た代謝経路 (25) が実際に存在することを, はじめて証明したものである。

表 8 に見られるように, 酵素濃度が低い時には CMA の生成度が MMA にくらべて相対的に低下したが, この時には, MSA の蓄積が逆に増加することがわかった。しかも, この MSA は, 図 12 からわかるように, 大部分が CoA 誘導体の形で存在してい

た。このことから、酵素濃度の効果の作用点は、主として $MS-CoA$ からの CoA の脱離反応の段階にあるように思われる。この反応がどのような機構で起こるのかということについては、今後、明らかにされるべきであろう。

Ajl らは、 CMA の生成機構を、 HGA の炭素鎖のつなぎ換えによって説明し、この反応は、これまでに知られているグルタミン酸 \rightleftharpoons β -メチルアスパラギン酸、およびメチルマロニル- $CoA \rightleftharpoons$ スクシニル- CoA というビタミン B_{12} 関与の異性化反応と、同じ型のものであると主張した(23)。しかし、Barker が述べている(57)ように、あとの2つの異性化反応は、グルタミン酸またはスクシニル- CoA 分子内のプロピオ

ン酸部分の， α および β -位の間を置換基が移動する

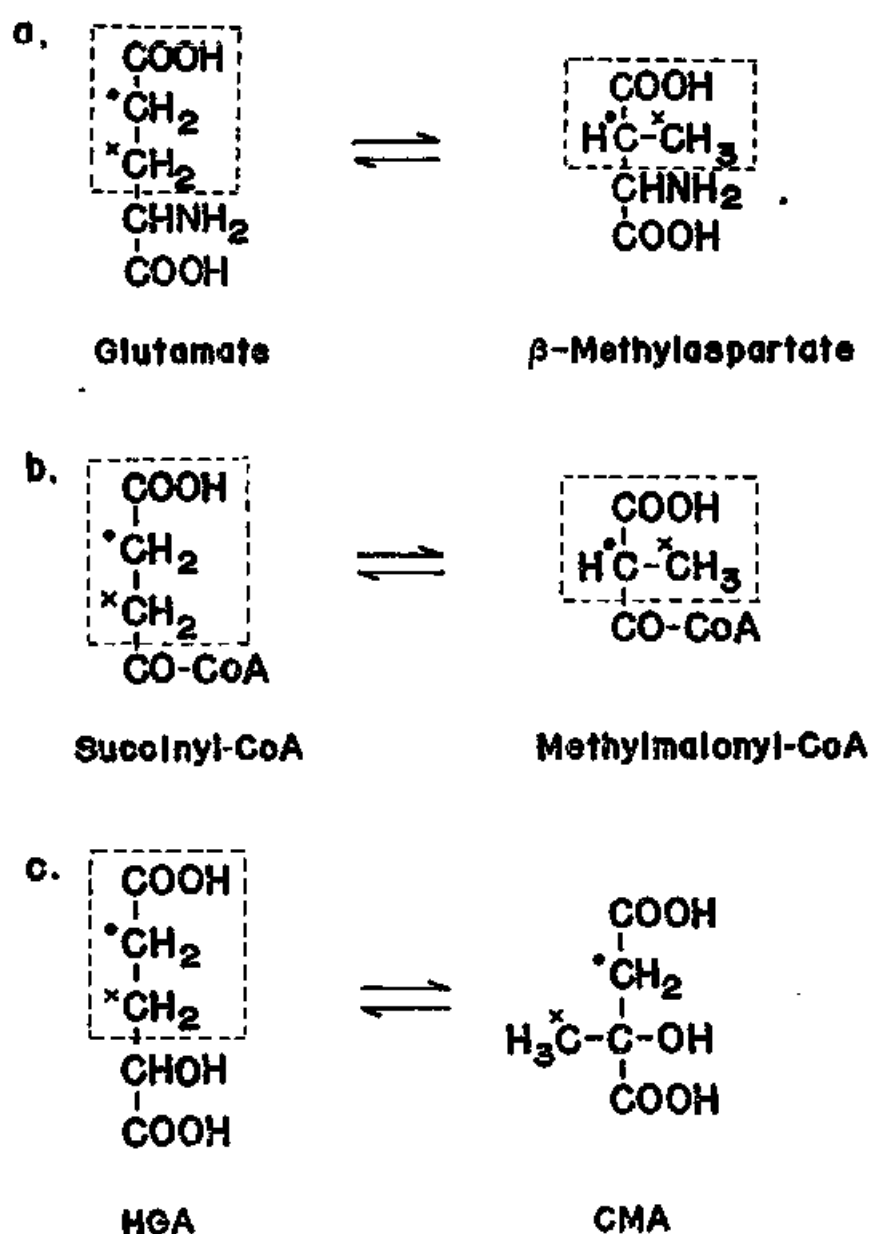
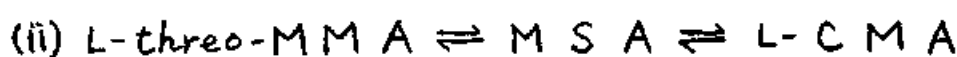
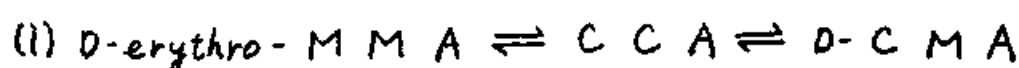
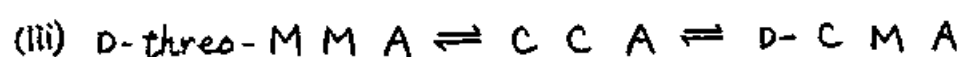


図15. グルタミン酸 \rightleftharpoons β -メチルアスパラギン酸(a), スクシニル-CoA \rightleftharpoons メチルマロニル-CoA (b), および HGA \rightleftharpoons CMA (c) の、各異性化反応の模式図。点線で囲んだ部分は、分子内のプロピオン酸部分を， \bullet と \times とは，その α -位および β -位の炭素原子をそれぞれ示す。

という機構(図15a, b)によって起こる。これに対して, A_{jl} らの主張する $HGA \rightleftharpoons CMA$ の反応(図15c)は, 明らかに反応機構が異なっている。 CMA の生成機構についてもまた, A_{jl} らの説は妥当性を欠いているように思われる。

序論の部分で述べたように, Nakano らによって分離された土壌菌は, 種々の $MM A$ 代謝経路を有しており, $MM A$ から CMA に至る経路も, この菌ではすでに幾つかが明らかにされている。これまでにわかっている知見をもとにして, これらの反応をまとめると, 次のようになる。





これら3つの反応に関与するのは、すべて遊離のカルボン酸である。本研究で明らかになった反応経路は、*erythro*-*MMA* から *MSA* を経て *L-CMA* が生成するという点と、*MMA* および *MSA* の *CoA* 誘導体が反応に関与しているという点において、上記の経路とは異なっている。なお、結果の項で述べたように、*MMA* の立体構造を明らかにすることはできなかったが、土壌菌で明らかになった上記の3つの経路と比較して考えるならば、*L*-型である可能性が強いように思われる。

次に、問題の経路の生理的役割について、少し考察してみたい。*Ajl*らは、彼らの主張する *CMA* 生

成経路が、大腸菌ではプロピオン酸の同化経路として働いていると考えた(58)。その根拠として彼らは、プロピオン酸を炭素源として生長した大腸菌に、HGAを生成する縮合酵素の活性が高いのに対し、酢酸を炭素源としたものでは、この活性が全く認められなかったことを挙げている(28)。しかし、彼らの主張する経路がプロピオン酸代謝に必要であるという説に対しては疑問も提出されており(59)、大腸菌におけるこの経路の役割は、必ずしも明らかではない。

一方、著者が明らかにした経路の酵素活性は、リンゴ酸のほか、酢酸またはグルタミン酸を炭素源として生長した R. rubrum にも、同程度に認められた。

また R. rubrum でのプロピオン酸の利用は、プロピオニル-CoA カルボキシラーゼ [EC 6.4.1.3] によって、幾酸固定を受けてメチルマロニル-CoA となった後、スクシニル-CoA を経て TCA サイクルに導入されるという経路によることが知られている (60, 61)。したがって本研究で明らかになった経路が、プロピオン酸の利用に必要であるとは考えにくい。

R. rubrum のプロピオニル-CoA カルボキシラーゼは、プロピオン酸を含まない培地で生長した菌にも、これを含む培地で生長したものと同程度の活性が見出されている。さらに、この菌を強光下で培養した場合には、弱光下で培養した場合にくらべて、この酵素の活性が上昇するという (62)。これらの事実は、

プロピオニル-CoAカルボキシラーゼが、この菌の間代謝において重要な役割を果たしていることを示唆している。またこの菌は、イソクエン酸開裂酵素[EC 4.1.3.1]を欠くため、グリオキシル酸サイクルの活性をもっていないとされているが、それにもかかわらず、このサイクルを構成する二番目の酵素、リンゴ酸合成酵素(グリオキシル酸とアセチル-CoAとを縮合させてリンゴ酸を生成する; EC 4.1.3.2)を恒常的に有している(41)。さらに、この菌には、アセチル-CoAとピルビン酸とを縮合させてCMAを生成する活性が見出されており(16)、しかも生成するCMAは、ロイシン生合成系の酵素である α -イソプロピルリンゴ酸合成酵素[EC 4.1.3.12]によって

生ずる D-型異性体のほかに，L-型異性体をも含むことが明らかになっている(17)。これらの知見を総合すると，問題の反応経路は，CMAの代謝と，プロピオニル-CoA およびグリオキシル酸の代謝とを つなぐ役割を果たしているのではないかと考えられる。

C5-分岐二塩基酸の生理的役割が明らかになっている例は，現在のところ殆ど無く，先に述べたように，Barker らが明らかにした C. tetanomorphum におけるグルタミン酸の嫌氣的分解系(22)が，その唯一のものであるといつてよい。しかし，これほど明確なものではないにせよ，C5-分岐二塩基酸が中間代謝に関与していることを推測させる例は，ほかにも幾つか挙げることができる。たとえば，Aspergillus 属

のある種の菌は，cis-アコニット酸の脱炭酸によってイタコン酸を培地中に蓄積するが，このイタコン酸は，さらに長時間培養を続けると再び減少する(13)。

また，Pseudomonas 属や Salmonella 属の数種の細菌は，イタコン酸を非適応的に同化できるという(63)。

最近，MMA がイソロイシンの生合成系において， α -ケト酪酸の前駆体となっているという説が提唱された。Charon らは，トレーサー実験の結果から，スピロヘータの一種，Leptospira interrogans の α -ケト酪酸生成経路として，次の2つの可能性を提示した(64)。

(i) $L\text{-CMA} \rightarrow \text{MSA} \rightarrow \beta\text{-メチルアスパラギン酸} \rightarrow \beta\text{-メチルオキサロ酢酸} \rightarrow \alpha\text{-ケト酪酸}$ ，(ii) $D\text{-CMA} \rightarrow \text{CCA} \rightarrow \text{MMA} \rightarrow \alpha\text{-ケト酪酸}$ 。ここで，CMA はアセ

チル-CoA と ピルビン酸 との 縮合 反応 によって 生ずる
 としている。一方、Vollbrecht は、経路 (ii) が、酵母に
 おいても機能している可能性を指摘した (65)。この
 説は、合成系トレオニン脱アミノ酵素 [EC 4.2.1.16]
 を欠損した酵母の突然変異株が、CCA を添加する
 ことによって生長を回復することを根拠としている。
 経路 (ii) は、以前から、酵母による α -プロパノールお
 よび α -ブタノール生成において、 α -ケト酪酸の供給
 系として機能しているといわれていた (66, 67)。

以上に述べたような知見から判断すると、MMA
 をも含めて C₅-分岐二塩基酸は、単に特殊な条件下
 に、特殊な生物によってのみ代謝されるのではなく、
 むしろ生物一般の中間代謝において重要な役割を果

しているのではないかと考えられる。図7の結果は、生成したCMAが、長時間のインキュベーションによって再び減少することを示している。CMAにつながる代謝反応としては、アセチル-CoA とピルビン酸への開裂反応や、イタコン酸への脱水反応などが考えられるが、実際に、生成したCMAがどのように代謝されてゆくのかは、先に述べたようなC₅-分岐二塩基酸の生理機能との関連を考慮しながら、今後検討されるべき問題であろう。

5. ま と め

Rhodospirillum rubrum の無細胞抽出液を用いて、プロピオニル-CoA とグリオキシル酸との縮合反応に関する研究を行なった。[^{14}C]プロピオン酸を、この菌の抽出液と共に、グリオキシル酸、ATP、CoA、 Mg^{2+} 、および Mn^{2+} の存在下にインキュベートしたところ、erythro-MMA、L-CMA、およびMSAに放射能が取込まれた。

MMA と CMA の生成を経時的に追跡した結果、CMA は MMA から二次的に導かれることが示された。また、CMA 分子内の放射性炭素の位置を調べたところ、CMA の α -カルボキシル基は、MMA の β -カルボキシル基に由来すること、すなわち、CM

AはMMAより，水酸基の移動によって生ずることが示唆された。非放射性MSAを，CMA生成反応系に添加しておいた場合，放射能が捕捉されること，およびMSAを無細胞抽出液と共にインキュベートするとCMAの生成が見られることなどから，MMAからCMAへの転換には，MSAが中間体として関与していると考えられた。さらにSephadex G-10カラムクロマトグラフィーの結果から，MMAおよびMSAのCoA誘導体が，反応にあずかっていることが示唆された。以上の知見をまとめて，次のような新しいL-CMA生成経路の存在を推定した。

プロピオニル-CoA + グリオキシル酸 → erythro-MM-

CoA → MS-CoA → MSA → L-CMA

謝 辞

本研究は、著者が京都大学理学部化学教室生物化学研究室において、大学院学生として行なったものである。本研究を進めるにあたり、懇切な御指導と変わぬ御鞭達をいただき、さらに本論文の御校閲を賜わった香月裕彦教授に、深く感謝致します。また、多くの御助言、御助力をいただいた共同研究者の中野英彦、戎野棟一両博士と鈴木信太郎氏、ならびに生物化学研究室の各位に、心から御礼申し上げます。

MMAの立体異性体の問題については、大阪大学蛋白質研究所の泉美治教授より、有益な御教示をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。また、旋光度の測定に関して御便宜をおはかり頂きま

した京都大学農学部の広海啓太郎教授に深く感謝致します。

文 献

1. Adler, J., Wang, S.-F., and Lardy, H.A. (1957) J. Biol. Chem. 229, 865-879
2. Wang, S.-F., Adler, J., and Lardy, H.A. (1961) J. Biol. Chem. 236, 26-30
3. Nagai, J. (1963) J. Biochem. 53, 181-187
4. Nagai, J. (1963) J. Biochem. 54, 34-40
5. Cooper, R. A. and Kornberg, H.L. (1964) Biochem. J. 91, 82-91
6. Katsuki, H., Ariga, N., Katsuki, F., Nagai, J., Egashira, S., and Tanaka, S. (1962) Biochim. Biophys. Acta 56, 545-551
7. Katsuki, H., Nagai, J., Wada, A., Fukuma, I., and Tanaka, S. (1963) J. Biochem. 53, 328-330
8. Rao, M.R. Raghavendra, Subramanian, S.S., Rahatekar, H.I., and Paranjape, S.V. (1963) Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 78-82
9. Subramanian, S.S. and Rao, M.R. Raghavendra (1968) J. Biol. Chem. 243, 2367-2372
10. Sasaki, K. and Katsuki, H. (1972) J. Biochem. 73, 599-608
11. Masakati, F.S., Rao, M.R. Raghavendra, Subramanian, S.S., and Jagannathan, V. (1972) Biochem. J. 128, 62P
12. Bentley, R. and Thiessen, C.P. (1957) J. Biol. Chem. 226, 673-687
13. Bentley, R. and Thiessen, C.P. (1957) J. Biol. Chem. 226, 689-701
14. Bentley, R. and Thiessen, C.P. (1957) J. Biol. Chem. 226, 703-720
15. Losada, M., Cánovas, J.L., and Ruiz-Amil, M. (1964) Biochem. Z. 340, 60-74
16. Benedict, C.R. (1962) Biochim. Biophys. Acta 56, 620-622
17. 島田 修史(1974) 京大・理・化学, 昭和48年度特殊研究論文
18. Gray, C.T. and Kornberg, H.L. (1960) Biochim. Biophys. Acta 42, 371-372
19. Losada, M., Trebst, A.V., Ogata, S., and Arnon, D.I. (1960) Nature 186, 753-760
20. Pettersen, J.E. and Stokke, O. (1973) Biochim. Biophys. Acta 304, 316-325
21. Ando, T., Rasmussen, K., Wright, J.M., and Nyhan, W.L. (1972) J. Biol. Chem. 247, 2200-2204
22. Barker, H.A. (1961) in "The Bacteria" (Gunsulus, I.G. and Steiner, R.Y., eds.) Vol. 2, pp. 151-207, Academic Press, New York
23. Buckel, W. and Bobi, A. (1976) Eur. J. Biochem. 64, 255-262
24. Le Bel, A. (1894) Bull. Soc. Chim. France [3], 11, 292
25. Korkes, S. (1956) Ann. Rev. Biochem. 25, 723-728

26. Reeves, H.C. and Ajl, S.J. (1962) *J. Bacteriol.* 84, 186-187
27. Reeves, H.C., Stahl, W.J., and Ajl, S.J. (1963) *J. Bacteriol.* 86, 1352-1353
28. Wegener, W.S., Reeves, H.C., Rabin, R., and Ajl, S.J. (1968) *Bacteriol. Rev.* 32, 1-26
29. Wong, D.T.O. and Ajl, S.J. (1956) *J. Am. Chem. Soc.* 78, 3230-3231
30. Rabin, R., Reeves, H.C., and Ajl, S.J. (1963) *J. Bacteriol.* 86, 937-944
31. Imai, K., Reeves, H.C., and Ajl, S.J. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 3193-3198
32. Reeves, H.C. and Ajl, S.J. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 97, 600-602
33. Rabin, R., Reeves, H.C., Wegener, W.S., Megraw, R.E., and Ajl, S.J. (1965) *Science* 150, 1548-1558
34. Nakano, H., Sasaki, K., Kurokawa, Y., and Katsuki, H. (1971) *J. Biochem.* 70, 429-440
35. Suzuki, S., Takeuchi, Y., Sasaki, K., and Katsuki, H. (1976) *J. Biochem.* 80, 867-874
36. Sasaki, K., Nakano, H., and Katsuki, H. (1971) *J. Biochem.* 70, 441-449
37. Nakano, H., Takagi, Y., and Katsuki, H. (1970) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 41, 1605-1610
38. 中野 英考 (1972) 理学博士学位論文
39. Porter, J. and Merrett, M.J. (1970) *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 7, 271-273
40. Hoare, D.S. (1963) *Biochem. J.* 87, 284-301
41. Kornberg, H.L. and Lascelles, J. (1960) *J. Gen. Microbiol.* 23, 511-517
42. Ohmori, H., Ishitani, H., Sato, K., Shimizu, S., and Fukui, S. (1971) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 43, 156-162
43. Ormerod, J.G., Ormerod, K.S., and Gest, H. (1961) *Arch. Biochem. Biophys.* 94, 449-463
44. Barker, H.A., Smyth, R.D., Wilson, R.M., and Weissbach, H. (1959) *J. Biol. Chem.* 234, 320-328
45. Barker, H.A. and Blair, A.H. (1962) in "Biochemical Preparations" (Coon, M.J. et al., eds.) Vol. 9, pp. 25-29, John Wiley and Sons, Inc., New York
46. Murai, T., Kawaguchi, A., Nakano, H., and Katsuki, H. (1971) *Agr. Biol. Chem.* 35, 242-247
47. Bray, G.A. (1960) *Anal. Biochem.* 1, 279-285
48. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

49. Tatsumi, S., Imaida, M., and Izumi, Y. (1966) Bull. Chem. Soc. Japan 39, 1818-1819
50. Rabin, R., Salamon, I.T., Bleiweis, A.S., Carlin, J., and Ajl, S.J. (1968) Biochemistry 7, 377-388
51. 桂 博太 (1956) 日本化学雜誌, 77, 1105-1107
52. Izumi, Y., Tatsumi, S., and Imaida, M. (1966) Bull. Chem. Soc. Japan 39, 2223-2226
53. Krebs, H.A. and Eggleston, L.V. (1943) Biochem. J. 37, 334-338
54. Calvo, J.M., Stevens, C.M., Kalyanpur, H.G., and Unbarger, H.E. (1964) Biochemistry 3, 2024-2027
55. Barker, H.A. (1969) in "Methods in Enzymology" (Lowenstein, J.M., ed.) Vol. 13, pp. 344-346, Academic Press, New York
56. Blair, A.H. and Barker, H.A. (1966) J. Biol. Chem. 241, 400-408
57. Barker, H.A. (1972) in "The Enzymes" (Boyer, P.D., ed.) Vol. 6, 3rd edition, pp. 509-537, Academic Press, New York
58. Reeves, H.C. and Ajl, S.J. (1963) Biochem. Biophys. Res. Commun. 12, 132-136
59. Kay, W.W. (1972) Biochim. Biophys. Acta 264, 508-521
60. Knight, M. (1962) Biochem. J. 84, 170-185
61. Olsen, I. and Merrick, J.M. (1968) J. Bacteriol. 95, 1774-1778
62. Porter, J. and Merrett, M.J. (1972) Plant Physiol. 50, 252-255
63. Martin, W.R., Frigan, F., and Bergman, E.H. (1961) J. Bacteriol. 82, 905-908
64. Charon, N.W., Johnson, R.C., and Peterson, D. (1974) J. Bacteriol. 117, 203-211
65. Vollbrecht, D. (1974) Biochim. Biophys. Acta 362, 382-389
66. Guymon, J.F., Ingraham, J.L., and Crowell, E.A. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 95, 163-168
67. Ingraham, J.L., Guymon, J.F., and Crowell, E.A. (1961) Arch. Biochem. Biophys. 95, 169-175